

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

30. 3. 2004

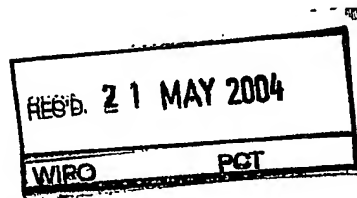
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 1 6 2 9 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 1 6 2 9 9]

出 願 人 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構
Applicant(s):

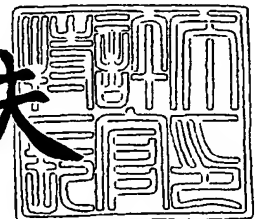


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03099-YS

【提出日】 平成15年 4月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/435
C12N 15/12
G01N 33/50
G01N 33/53

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤とアポトーシス誘導方法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県市川市若宮 1 - 3 1 - 6

 【氏名】 島田 英昭

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区矢作町 5 4 0 - 3 6

 【氏名】 松下 一之

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区矢作町 5 4 0 - 6 9

 【氏名】 朝長 毅

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市若葉区都賀の台 1 - 2 0 - 1 1

 【氏名】 野村 文夫

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区汐見が丘 7 - 1 5

 【氏名】 落合 武徳

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘導剤とアポトーシス誘導方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 FBPタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが細胞内に導入可能な形態を有することを特徴とするアポトーシス誘導剤。

【請求項 2】 FBPタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、FIRタンパク質をコードするポリヌクレオチドである請求項 1 のアポトーシス誘導剤。

【請求項 3】 FBPタンパク質と相互作用するタンパク質またはペプチドが細胞内に導入可能な形態を有するアポトーシス誘導剤。

【請求項 4】 FBPタンパク質と相互作用するタンパク質が、FIRタンパク質である請求項 3 のアポトーシス誘導剤。

【請求項 5】 c-myc遺伝子発現により増殖する細胞にアポトーシスを誘導する方法であって、請求項 1 から 4 のいずれかのアポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法。

【請求項 6】 細胞が癌細胞である請求項 5 の方法。

【請求項 7】 細胞が哺乳動物の体内にある細胞である請求項 5 または 6 の方法。

【請求項 8】 哺乳動物がヒトである請求項 7 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分】

この出願の発明は、アポトーシス誘導剤とアポトーシス誘導方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、その存在が宿主動物にとって有害となるような細胞（例えば癌細胞）にアポトーシスを誘導するための薬剤と、この薬剤を用いてアポトーシスを誘導する治療方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アポトーシス (apoptosis) は、生理的条件下で細胞自らが積極的に引き起こす細胞死であり、環境悪化による細胞死（壊死：ネクローシス）と明確に区別されている。このアポトーシスは、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表層微絨毛の消失、細胞質の凝集等を形態学的な特徴としている。アポトーシスを生じた細胞は萎縮し、細胞内容物は外部に放出されずにマクロファージや周囲の細胞に速やかに取り込まれるため、炎症が引き起こされず、周囲の細胞に影響を与えることはない。従って、その存在が宿主生物にとって有害である細胞（例えば癌細胞等）にアポトーシスを誘導することによって疾患を治療する試みが多くなされている。

【0003】

これまでに、アポトーシスを誘導する手段、因子としては、例えばグルココルチコイド処理、サイトトキシック-T細胞による細胞障害、ホルモン依存性組織の萎縮、放射線照射、NK細胞、キラー細胞、腫瘍壊死因子 (TNF)、リンホトキシン (LT) 等のサイトカイン類等が報告されている（非特許文献1～9）。また、ある種の抗体（例えば抗CD3抗体、抗APO-I抗体等）によってもアポトーシスが誘導されることも知られている（非特許文献10～12）。さらに、タンパク質合成阻害剤であるCycloheximideは急性白血病細胞に、RNA合成阻害剤であるActinomycin Dは小腸陰窩細胞に、そして両者がHL-60細胞にそれぞれアポトーシスを誘導することも報告されている（非特許文献13）。アポトーシスに関連する治療法としては、前記抗Apo-I抗体による癌治療の試みの他、芽球の活発な増殖に起因する骨髓異形成症候群（MDS）に対するetoposideやacliarubicinの投与が検討されている（非特許文献14）。これらの他にも、アポトーシスの誘導方法やそのための薬剤組成物の発明が知られている（例えば、特許文献1～5等）。

【0004】

一方、c-myc遺伝子にコードされるc-Mycタンパク質は、細胞の増殖や分化、細胞周期といった細胞の生命活動に極めて重要であるばかりか、細胞の腫瘍化（形質転換）にも深く関与している。多くの癌組織でc-Mycタンパク質の発現増大が認められ、c-myc遺伝子導入により細胞の腫瘍化が認められる。さらにこのc-Mycタンパク質はアポトーシスとも関係しており、c-Mycタンパク質の細胞内の発現

量が増加しても減少してもアポトーシスが誘導される（非特許文献15）。例えばヒト白血病細胞におけるグルココルイチコイドを用いた実験ではアポトーシス誘導にc-myc遺伝子の抑制が必須である（非特許文献16～19）。B細胞を用いた系ではアポトーシスを誘導する化学物質はいずれもc-myc遺伝子の発現抑制と深くかかわっている（非特許文献20～23）。また、c-mycのアンチセンスオリゴヌクレオチドをいくつかの種類の細胞に導入するとアポトーシスが誘導される（非特許文献15）。一方、IL-3依存性の骨髓細胞において、IL-3を枯渇させると同時にc-myc遺伝子を強制発現させるとアポトーシスが誘導される（非特許文献24）。また血清を取り除いた培地でRat1線維芽細胞にc-myc遺伝子を強制発現させるとアポトーシスが誘導される（非特許文献25）。

【0005】

このc-Mycタンパク質はc-myc遺伝子の転写により産生され、c-myc遺伝子は多くの転写因子によって厳密に制御されているが、それがどのように転写制御されているのかについては不明の点が多い。例えば、70-80%の大腸癌で異常の見られるAPC(adenomatous polyposis coli)遺伝子は、癌発生の最も初期に異常が起こるといわれている。APCタンパク質は、Wnt/Winglessシグナル伝達経路により安定化される β カテニンに結合してその働きを抑制している。 β カテニンは転写因子Tcf/Lefと結合してc-myc遺伝子の転写を活性化する。従ってAPC遺伝子に異常が起こると β カテニンの活性を抑制できずにc-myc遺伝子が持続的に活性化され、細胞の増殖がひき起こされると考えられている。

【0006】

c-Mycタンパク質の発現はWnt/Winglessシグナル伝達経路以外にも多くの転写因子の影響を受けている。例えばヒト前骨髓性白血病細胞であるHL60はDMSO (Dimethyl sulfoxide; Me₂SO)、retinoic acid、phorbol esters、ビタミンD誘導体等種々の化学物質により分化誘導され、その際には細胞内c-Mycタンパク質の発現が減弱することが知られている。これらの事実、種々の分化誘導物質が様々な転写因子を活性化しc-myc遺伝子に影響を与えるが、最終的には一つの経路に集約されてc-myc遺伝子の転写を抑制していることが示唆される。

【0007】

このような考えからc-myc遺伝子上流のどの部位がその転写に影響を与えるかが解析された結果、c-myc遺伝子の転写開始部位の1.5kbも上流の百数十塩基の部位がc-myc遺伝子の転写に極めて重要であることが示され、FUSE (Far Upstream Element) と命名された (非特許文献26)。次にFUSEに結合する蛋白質がoligonucleotide affinity chromatographyによって解析され、70kDaの分子量を有するFBP (FUSE結合タンパク質; FUSE Binding Protein) が同定された。またこのFBPタンパク質はそれ自体が強力な転写活性を有し、c-myc遺伝子を制御している可能性が示されている (非特許文献27~29)。そしてさらに、このFBPタンパク質に結合 (相互作用) するタンパク質としてFIR (FBP Interacting Repressor) が同定され (非特許文献30)、このFIRは基本転写因子TFIIHの機能を抑制することによりc-myc遺伝子を転写抑制することが示されている (非特許文献31)。ただし、このFIRがアポトーシスを誘導することは一切知られていない。

【 0 0 0 8 】**【特許文献1】**

特開2001-275681号公報

【特許文献2】

特表2002-526109号公報

【特許文献3】

特表平10-508575号公報

【特許文献4】

特開平9-328425号公

【特許文献5】

国際公開第W095/28154号パンフレット

【非特許文献1】

Wyllie, A.H., Nature 284:555-556, 1986

【非特許文献2】

Wyllie, A.H. et al., Int.Rev.Cytol. 68:251, 1980

【非特許文献3】

Duvall, E. and Wyllie, A.H., Immunology Today, 7:115-119, 1986

【非特許文献4】

Sellins, K.S. et al., J.Immunol. 139:3199, 1987

【非特許文献5】

Yamada, T. et al., Int.J.Radiat. Biol. 53:65, 1988

【非特許文献6】

Schmid, D.S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83:1881-1885, 1986

【非特許文献7】

John, C. et al., J. Immunol. 129 (4) :1782-1787, 1982

【非特許文献8】

Howell, D.M. et al., J.Immunol. 140:689-692, 1988

【非特許文献9】

Gillian, B. et al., Eur.J.Immunol. 17:689-693, 1987

【非特許文献10】

Trauth, B.C. et al., Science 245:301-305, 1989

【非特許文献11】

Smith, C.A. et al., Nature 337:181-184, 1989

【非特許文献12】

Tadakuma, T. et al., Eur. J, Immunol. 20:779, 1990

【非特許文献13】

Martin, S.J. et al., J.Immunol. 145:1859-1867, 1990

【非特許文献14】

Shibuya, T. J.Clinical and Experimental Medicine 160 (5) :319-323, 1

992

【非特許文献15】

Thompson, E. B. Ann. Rev. Physiol. 60: 575-600, 1998

【非特許文献16】

Thulasi, R., et al. J. Biol. Chem. 268: 18306-18312, 1993

【非特許文献17】

Zhou, F. et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 73:195-202, 2000

【非特許文献18】

Thompson, E. A. et al. Cancer Res., 51: 5544-5550, 1991

【非特許文献19】

Helmberg, A. et al. EMBO J., 14: 452-60, 1995

【非特許文献20】

McCormack, J. E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 81:5546-5550,
1984.

【非特許文献21】

Sonenshein, G. E. J. Immunol. 158:1994-1997, 1997

【非特許文献22】

Fischer, G. et al. J. Exp. Med., 179:221-228, 1994

【非特許文献23】

Wu, M. et al. Mol. Cell. Biol. 16:5015-5025, 1996

【非特許文献24】

Askew, D. S. ET AL. Oncogene 6: 1915-1922, 1991

【非特許文献25】

Evan, G. I. et al. Cell 69: 119-128, 1992

【非特許文献26】

Avigan, M. et al. J. Biol. Chem., 265:18538-18545, 1990

【非特許文献27】

Bazar, L. et al. J. Biol. Chem., 270: 8241-8248, 1995

【非特許文献28】

Duncan, R. et al. Genes Dev., 8:465-480, 1994

【非特許文献29】

Michelotti, G.A. et al. Mol. Cell. Biol. 16:2656-2669, 1996

【非特許文献30】

Liu, J. et al. Mol. Cell, 5: 331-341, 2000

【非特許文献31】

Liu, J. et al. Cell, 104: 353-363, 2001

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、c-Mycタンパク質は細胞の癌化とアポトーシスに深く関与しており、その発現を制御することによって癌細胞を死滅させることが期待されている。しかしながら、前記のとおりc-Mycタンパク質はその発現量が増大しても減少してもアポトーシスを生じさせるため、その発現制御によるアポトーシス誘導は容易ではない。また、c-Mycタンパク質の発現抑制によるアポトーシス誘導の手段としてグルココルチコイドやc-myc遺伝子のアンチセンス鎖を用いる方法が提案されているが（非特許文献15～19）、副作用の点や安定した効果の点で臨床的使用には好ましいものではない。

【0010】

この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、c-myc遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に誘導するための新しい手段を提供することを好ましい態様としている。

【0011】

またこの出願は、前記アポトーシス誘導の手段を用いて動物個体内の細胞、特にその存在が宿主動物にとって有害となるような細胞にアポトーシスを誘導する方法を提供することを課題としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが細胞内に導入可能な形態を有することを特徴とするアポトーシス誘導剤。

【0013】

また第2の発明として、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質またはペプチドが細胞内に導入可能な形態を有するアポトーシス誘導剤を提供する。

【0014】

この第1発明および第2発明のアポトーシス誘導剤においては、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質が、FIRタンパク質であることを好ましい態様として

いる。

【0015】

この出願はさらに、第3の発明として、c-myc遺伝子発現により増殖する細胞にアポトーシスを誘導する方法であって、前記のアポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法を提供する。

【0016】

この第3発明の方法においては、細胞が癌細胞であることを好まし態様として
いる。

【0017】

またさらに、第3発明の方法においては、細胞が哺乳動物の体内にある細胞であること、そして哺乳動物がヒトであることをそれぞれ好ましい態様としている。

【0018】

なお、この発明において、「FBPタンパク質と相互作用するタンパク質」とは、FBPタンパク質と結合して、FBPタンパク質の機能（すなわちc-myc遺伝子の転写活性）に対して抑制的に働くタンパク質を意味する。

【0019】

また「ポリヌクレオチドが細胞内に導入可能な形態」とは、ポリヌクレオチドが細胞内に導入され、そのポリヌクレオチドがコードするタンパク質またはペプチドが発現可能である形態を意味する。

【0020】

また「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合（ペプチド結合）によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。「ポリヌクレオチド」とは、プリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル（ATP、GTP、CTP、UTP；またはdATP、dGTP、dCTP、dTTP）が100個以上結合した分子を言い、「オリゴヌクレオチド」とは2-9個連結した分子を言う。

【0021】

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例にお

いて詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の治療方法等に使用可能な薬剤の調製はRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995等に記載されている。

【0022】

【発明の実施の形態】

第1発明のアポトーシス誘導剤は、ヒトFBPタンパク質と相互作用するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する薬剤であり、第2発明のアポトーシス誘導剤は、ヒトFBPタンパク質と相互作用するタンパク質それ自体を含有する薬剤である。このようなタンパク質としては、ヒトFIRタンパク質（非特許文献30、31；GenBank/NM_14281）、ヒトSIAHBP1 (siah binding protein 1: GenBank/BC008875)、ヒトSIAHBP1の転写バリエーション1 (GenBank/NM_078480)、ヒトSIAHBP1の転写バリエーション2 (GenBank/NM_014281) 等が知られており、これらを対象とすることができる。この出願の発明では、特に好ましいものとしてヒトFIRタンパク質（配列番号2）を提供する。

【0023】

第1発明の薬剤に使用するポリヌクレオチドは、前記の各タンパク質をコードするゲノムDNA、ゲノムDNAの転写産物であるmRNA、このmRNAを鋳型として合成されるcDNA等を利用することができるが、cDNAが特に好ましい。このcDNAは、前記の公知配列を利用し、公知の方法によって取得することができる。例えば、公知の方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; J. Gene 25, 263-269, 1983; Gene, 150, 243-250, 1994) を用いてcDNAライブラリーを合成し、前記の公知配列（例えばFIRタンパク質をコードする配列番号1）の塩基配列に基づいて作製したプローブDNAを用いて、目的のcDNAを単離することができる。得られたcDNAは

、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法およびSDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。また、公知配列に基づいて作製したプライマーセットを用い、ヒト細胞から単離したmRNAを鋳型とするRT-PCR法によっても必要量の各cDNAを得ることができる。プライマーセットは、プライマー設計用の市販のソフトウェア、例えばOligo™ [National Bioscience Inc. (米国) 製]、GENETYX [ソフトウェア開発 (株) (日本) 製] 等を用いることによって作製することができる。

【0024】

以上のポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクターに組み込むことによって細胞内に導入可能な形態とすることができる。発現ベクターは、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する公知の真核細胞用発現ベクターを使用することができ、この発現ベクターのクローニングサイトに、前記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入することによってポリペプチド発現ベクターを構築することができる。

【0025】

この発現ベクターは、in vitro細胞（培養細胞）に対しては、例えば電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の公知の方法によって細胞内に導入することができる。

【0026】

またこの発現ベクターは、in vivo細胞（すなわち動物個体内の細胞）に対しては、例えば生体認識分子を提示した中空ナノ粒子、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペス単純ウイルス等に組み込むようにすればよい。このような薬剤は、遺伝子治療の手法により生体内に導入することができる（例えば、特開2003-24092号公報、特開2003-501445号公報等）。

【0027】

第2発明の薬剤は、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質それ自体が細胞内に導入可能な形態を有することを特徴とする。

【0028】

タンパク質は、公知のアミノ酸配列（例えばFIRタンパク質の場合は配列番号2のアミノ酸配列）に基づいてペプチドを化学合成する方法や、前記の発現ベクターからのインビトロ転写や、発現ベクターによる形質転換細胞の発現産物としてポリペプチドを単離精製する方法等によって取得することができる。例えば、ポリペプチドをインビトロ翻訳で発現させる場合には、RNAポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、ポリペプチドをインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。また、ポリペプチドを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクロニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のDNA断片組換えて発現ベクターを作成する。この発現ベクターで宿主細胞を形質転換すれば、ポリペプチドを発現する形質転換体細胞を得ることができ、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的のポリペプチドを大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。さらに、ポリペプチドを真核細胞で発現させる場合には、前記のDNA断片を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製する。このベクターを真核細胞内に導入すれば、目的のポリペプチドを発現する形質転換真核細胞を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞HEK293、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラ

ン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現させたポリペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせる行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0029】

以上の方法により得られたタンパク質（ポリペプチド）を細胞内に導入可能な形態するためには、例えば、このタンパク質の構造や機能を変更することなく、かつ薬理学的に許容される担体溶液にタンパク質分子を混合して製剤化することができる。そしてこのような薬剤は、例えばin vitro細胞に対してはマイクロインジェクション法により細胞内に導入することができる。あるいは、脂質による細胞内導入法（BioPORTER（Gene Therapy Systems社、米国）、Chariot（Active Motif社、米国）等）を採用することもできる。

【0030】

また別の態様としては、タンパク質（ポリペプチド）のN端側に細胞膜通過ペプチドを連結させた融合ポリペプチドとすることによって、タンパク質を細胞内に導入可能な形態することもできる。この細胞膜通過ペプチドを備えることによって、タンパク質は細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる。細胞膜通過ペプチドとしては、HIV-1・TATのPTD（protein transduction domain）またはショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアのPTD等を使用することができる。例えばHIV-1・TATの場合にはそのアミノ酸配列およびそのcDNAの塩基配列が公知であり（Science, 285:1569-1572, 1999; GenBank Accession NO. U39362 M96155）、そのPTDに相当する領域（HIV・TATの47～57番アミノ酸配列）をコードするDNA断片を前記cDNAと連結して融合DNA断片を作成し、この融合DNA断片を大腸菌等の宿主細胞で発現させることによって、N末端側にPTDペプチドを連結し融合ポリペプチドを作成することができる。また、アンティペディアのPTDも公知であり（例えば、GenBank Accession No. AE001573）、同様にしてPTDを連結した融合ポリペプチドを作成することができる。あるいはまた、2価の架橋

剤（例えば、EDCや β -アラニン等）を介して、ポリペプチドとPTDペプチドを結合させる方法によって細胞膜通過ペプチドを連結した融合ポリペプチドを作成することもできる。

【0031】

第3発明は、c-myc遺伝子発現により増殖する細胞に前記第1発明または第2発明のアポトーシス誘導剤を細胞に接触させることを特徴とするアポトーシス誘導方法である。なお、c-myc遺伝子は殆ど全ての動物細胞においてその増殖に関与することから、この発明の方法は実際には全ての動物細胞のアポトーシスを誘導するために適用することができるが、特に、c-myc遺伝子の過剰発現によって癌化した細胞を対象とすることが好ましい。

【0032】

この第3発明の方法は、in vitro細胞（培養細胞）を対象とすることもでき、in vivo細胞（動物体内の細胞）を対象とすることができる。in vitro細胞を対象とする場合は、前記のとおり、タンパク質発現ベクターを電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法で細胞内に導入する方法、またタンパク質それ自体の溶液をマイクロインジェクションする方法や脂質を介して細胞に導入する方法、あるいはPTDペプチド融合タンパク質を培養細胞に接触させる方法等によって実施することができる。

【0033】

in vivo細胞を対象とする場合は、前記のとおり、ポリヌクレオチドを遺伝子治療に準じた方法により体内細胞に導入する方法や、タンパク質それ自体の溶液を体内細胞にマイクロインジェクションする方法や脂質を介して細胞に導入する方法、あるいはPTDペプチド融合タンパク質溶液を体内に投与する方法等によって実施することができる。

【0034】

in vivo細胞は、全ての動物個体内の細胞を対象とすることができるが、特に、有用動物（家畜、愛玩動物等）の癌治療等を目的とするアポトーシス誘導が好ましい。また、ヒトの癌治療を目的とするアポトーシス誘導がさらに好まし。

【0035】

なお、タンパク質またはポリペプチドの治療的有効量（すなわち、有効量）は、約0.001～30mg/kg体重の範囲、好ましくは約0.01～25mg/kg体重、より好ましくは約0.1～20mg/kg体重、さらにより好ましくは約1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kgまたは5～6mg/kg体重の範囲である。またタンパク質をコードするポリヌクレオチドを遺伝子治療等の方法によって導入する場合は、前記の範囲量のタンパク質を発現しうるポリヌクレオチドを投与すればよい。

【0036】

以下、実施例として、FBPタンパク質と相互作用するタンパク質としてFIRタンパク質の作用効果を確認した実験結果を示すが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0037】

【実施例】

1. 方法

1-1. 発現プラスミドの作製

完全長FIR（配列番号2）と、FIRの転写活性部位であるN端側77個のアミノ酸配列（配列番号2のa. a. 1-77）を削除した変異FIR cDNAをそれぞれpCGNM2 vector plasmid (Liu, J. et al. Cell, 104: 353-363, 2001) に組み込み、それぞれの発現プラスミド（HA-FIRとHA-FIR Δ N77）を作製した。c-myc プロモーターをchloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子上流に持つレポータープラスミドを、HA-FIRまたはHA-FIR Δ N77とHeLa細胞にコトランスフェクションし、CATの発現抑制を調べた。

1-2. ヒト大腸癌組織標本の採取。

【0038】

原発性大腸癌の治療目的で入院した患者から、術前に文書による同意を得たうえで、癌部と、癌部から5-10cm離れた非癌組織を摘出から1時間以内に採取し、マイナス80度に保存した。二人の病理医が組織診断を行い、摘出された組織が腺癌であることを確認した。

1-3. CATアッセイ

HeLa細胞を10% fetal calf serumを加えたDulbecco's Modified Eagle's Medi

um (DMEM, Gibco-BRL) で培養し、電気穿孔法 (electroporation) により HA-FIR または HA-FIR Δ N77 を遺伝子導入した。遺伝子導入から 48 時間後、文献 (Tomonaga, T. et al. J. Biol. Chem., 270: 4875-4881, 1995) の記載に従い、CAT の発現を調べた。

1-4. 免疫組織化学的染色

HeLa 細胞をカバーガラス上で培養し、Lipofectamine Plus reagents (Gibco BRL) で遺伝子を導入した。遺伝子導入から 18 時間後、文献 (Pelengaris, S. et al. Cell, 109: 321-334, 2002) の記載に従い、免疫組織化学的染色により c-Myc と HA-FIR の発現の関係を分析した。マウス抗 HA モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA) とウサギ抗 c-Myc ポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology, NY) をそれぞれ blocking buffer (Pelengaris, S. et al. Cell, 109: 321-334, 2002) で 500 倍および 1,000 倍希釈したものを 1 次抗体として使用した。カバーガラス上の細胞を 4%-パラホルムアルデヒドで固定後、PBS で洗浄し、室温で 1 次抗体と 1 時間反応させた。その後 PBS で再度洗浄し、二次抗体 [ローダミン標識-抗マウス IgG (Roche)、蛍光イソチオシアネート (FITC) 標識-抗ウサギ IgG (Sigma) をそれぞれ前記 blocking buffer で 1,000 倍および 500 倍に希釈したもの] を反応させた。細胞核の DNA を diamidinophenylindole (DAPI, 1 μ g/ml) で染色し、免疫蛍光顕微鏡 (Leica QFISH; Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で観察した。

1-5. フローサイトメトリー解析

FIR による c-myc 遺伝子の抑制を定量化するため、文献 (Pelengaris, S. et al. Cell, 109: 321-334, 2002) の記載に従い、フローサイトメトリーを用いた two-color 解析を行った。遺伝子導入から 22 時間後の HeLa 細胞をトリプシン処理し、前記の一次抗体を用いて FIR と c-Myc をそれぞれ染色した。二次抗体は FITC 標識-抗ウサギ IgG (Sigma) と R-PE 標識-抗マウス IgG (PharMingen) をそれぞれ 200 倍希釈したものをを用いた。10,000 個の細胞をカウントし、c-Myc-FITC を FL1 チャンネルで、HA-PE を FL2 チャンネルで検出した。PE 陽性細胞を X 軸で表示した。

1-6. アポトーシスの検出

アポトーシスは TUNEL assay (Apoptosis Detection System, Fluorescein. Pr

omega, WI, USA) により検出した。すなわち、カバーガラス上で培養したHeLa細胞を4%-パラホルムアルデヒドで固定後-20℃エタノールで2時間固定し、PBSで2回洗浄し、アポトーシスをおこした細胞を、FITC標識したdUTPを含む50 μ lのTdT buffer (MEBSTAIN Apoptosis Kit: Medical & Biological Laboratories, JAPAN) で染色した。HeLa細胞を1 unit/ml DNase I (GenHunter Corporation, Nashville, TN) で処理し、この細胞を陽性コントロールとした。細胞核DNAはDAPI II I Counterstain (Vysis, Abbott Park, IL) で染色し、蛍光顕微鏡 (Leica QFISH; Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で観察した。

【0039】

2色分析は、細胞をトリプシン処理後軽く遠沈し (300×g、10分間)、FITC標識したdUTPを含む50 μ lのTdT buffer中 (MEBSTAIN Apoptosis Kit: Medical & Biological Laboratories, JAPAN) で反応させた。最後に250 μ g のDNase-free RNase Aを含む0.5 mlのpropidium iodide (PI) 溶液に細胞を混和した。10,000個の細胞をカウントし、FITCをFL1に、PIをFL2に対応させた。アポトーシス細胞はY軸のFITC-陽性細胞として示した。

2. 結果

2-1. FIRによるc-myc遺伝子の転写抑制

これまでの研究から、FIRはFBP、E1a (いずれも強い転写刺激因子) による転写活性を抑制するが、VP16 (別の転写刺激因子) による転写活性は抑制しない。すなわち、FIRは転写活性因子依存性の転写抑制因子であることが判明している。また、c-mycプロモーターにより転写される遺伝子を細胞内に導入すると、その遺伝子産物はFIRによりその発現が抑制される (外因性のc-mycプロモーターはFIRによって抑制される) (Liu, J., et al. Mol. Cell, 5: 331-341, 2000)。そこで先ず、外因性のc-mycプロモーターに対してFIRが転写抑制能を有するか否かをCATアッセイを用いて調べたところ、FIRは著明にCATの発現を抑制した。しかし、アミノ末端を削除した変異FIRは正常のFIRに比べCATの発現抑制が減弱していた (図1)。

【0040】

次に、細胞内にもともと存在するc-myc遺伝子のプロモーター (内因性のc-myc

プロモーター) がFIRによって転写抑制されるか否か調べた。外因性のc-mycプロモーターと同様に内因性のc-mycプロモーターもFIRによって抑制され、その結果、細胞に発現するc-Mycタンパク質の発現が減弱した。すなわち、FIR発現プラスミドをHeLa細胞に導入し、免疫組織化学による蛍光顕微鏡下の観察(図2)と、それを定量化したフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、c-Mycタンパク質の発現が顕著に抑制されることが確認された(図3)。

2-2. FIRによる細胞死(アポトーシス)誘導

c-myc遺伝子を転写抑制することにより細胞死(アポトーシス)が誘導されることが知られている(例えば、Thompson, E. B. et al. Ann. Rev. Physiol. 60: 575-600, 1998参照)。従ってc-myc遺伝子転写抑制因子であるFIRによって、アポトーシスが誘導される可能性がある。この可能性を検証するため、全長FIRと、N端側の76アミノ酸配列を削除した変異FIRをそれぞれHeLa細胞に遺伝子導入し、TUNEL法を用いて細胞のアポトーシスを調べた。結果は図4に示したとおりであり、FIR導入細胞では細胞核の断片化を伴うアポトーシスが観察された。またアポトーシスの認められた細胞を定量化するために2色分析(two-color analysis)を行ったところ、予測された通りにコントロールプラスミッドではほとんどアポトーシスが誘導されなかったが、FIRを遺伝子導入した細胞では16.5%の細胞にアポトーシスが誘導された(図5)。またアミノ末端の77アミノ酸残基を削除した変異FIRでは6.6%の細胞にアポトーシスが誘導された。以上の結果からFIRによるアポトーシスの誘導はc-myc遺伝子を抑制することにより引き起こされることが確認された。

【0041】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、c-myc遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に有効するための新しい手段が提供される。これによって癌治療に新たな途が拓かれる。

【0042】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Method for inducing apoptosis and apoptosis inducing agent

<130> NP03099-YS

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1693)

<300>

<301> Liu, J. et al.

<302> Defective interplay of activators with TFIH in xeroderma
pigmentosum

<303> Cell

<304> 104

<305> 3

<306> 353-353

<307> 2001

<308> GenBank/NM_14281

<309> 2001-12-26

<313> 1 TO 1853

<400> 1

atcgcgcgag acagcggaag gagcaagagt gggaggcgcg cgcggaggcc gcgacggacg 60

caag atg gcg acg gcg acc ata gct ctc cag gtc aat ggc cag caa gga 109

Met Ala Thr Ala Thr Ile Ala Leu Gln Val Asn Gly Gln Gln Gly

1 5 10 15

ggg ggg tcc gag ccg gcg gcg gcg gcg gca gtg gtg gca gcg gga gac 157

Gly Gly Ser Glu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Asp

20 25 30

aaa tgg aaa cct cca cag ggc aca gac tcc atc aag atg gag aac ggg 205

Lys Trp Lys Pro Pro Gln Gly Thr Asp Ser Ile Lys Met Glu Asn Gly

35 40 45

cag agc aca gcc gcc aag ctg ggg ctg cct ccc ctg acg ccc gag cag 253

Gln Ser Thr Ala Ala Lys Leu Gly Leu Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gln

50 55 60

cag gag gcc ctt cag aag gcc aag aag tac gcc atg gag cag agc atc 301

Gln Glu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Lys Tyr Ala Met Glu Gln Ser Ile

65 70 75

aag agt gtg ctg gtg aag cag acc atc gcg cac cag cag cag cag ctc 349

Lys Ser Val Leu Val Lys Gln Thr Ile Ala His Gln Gln Gln Gln Leu

80

85

90

95

acc aac ctg cag atg gcg gct cag cgg cag cgg gcg ctg gcc atc atg 397

Thr Asn Leu Gln Met Ala Ala Gln Arg Gln Arg Ala Leu Ala Ile Met

100

105

110

tgc cgc gtc tac gtg ggc tct atc tac tat gag ctg ggg gag gac acc 445

Cys Arg Val Tyr Val Gly Ser Ile Tyr Tyr Glu Leu Gly Glu Asp Thr

115

120

125

atc cgc cag gcc ttt gcc ccc ttt ggc ccc atc aag agc atc gac atg 493

Ile Arg Gln Ala Phe Ala Pro Phe Gly Pro Ile Lys Ser Ile Asp Met

130

135

140

tcc tgg gac tcc gtc acc atg aag cac aag ggc ttt gcc ttc gtg gag 541

Ser Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu

145

150

155

tat gag gtc ccc gaa gct gca cag ctg gcc ttg gag cag atg aac tcg 589

Tyr Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser

160

165

170

175

gtg atg ctg ggg ggc agg aac atc aag gtg ggc aga ccc agc aac ata 637

Val Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile

180

185

190

ggg cag gcc cag ccc atc ata gac cag ttg gct gag gag gca cgg gcc 685

Gly Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala

195

200

205

ttc aac cgc atc tac gtg gcc tct gtg cac cag gac ctc tca gac gat 733
Phe Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp
210 215 220

gac atc aag agc gtg ttt gag gcc ttt ggc aag atc aag tcc tgc aca 781
Asp Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr
225 230 235

ctg gcc cgg gac ccc aca act ggc aag cac aag ggc tac ggc ttc att 829
Leu Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile
240 245 250 255

gag tac gag aag gcc cag tcg tcc caa gat gct gtg tct tcc atg aac 877
Glu Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn
260 265 270

ctc ttt gac ctg ggt ggc cag tac ttg cgg gtg ggc aag gct gtc aca 925
Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr
275 280 285

ccg ccc atg ccc cta ctc aca cca gcc acg cct gga ggc ctc cca cct 973
Pro Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro
290 295 300

gcc gct gct gtg gca gct gct gca gcc act gcc aag atc aca gct cag 1021
Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln
305 310 315

gaa gca gtg gcc gga gca gcg gtg ctg ggt acc ctg ggc aca cct gga 1069
Glu Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly
320 325 330 335

ctg gtg tcc cca gca ctg acc ctg gcc cag ccc ctg ggc act ttg ccc 1117
Leu Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro
340 345 350

cag gct gtc atg gct gcc cag gca cct gga gtc atc aca ggt gtg acc 1165
Gln Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr
355 360 365

cca gcc cgt cct cct atc ccg gtc acc atc ccc tcg gtg gga gtg gtg 1213
Pro Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val
370 375 380

aac ccc atc ctg gcc agc cct cca acg ctg ggt ctc ctg gag ccc aag 1261
Asn Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys
385 390 395

aag gag aag gaa gaa gag gag ctg ttt ccc gag tca gag cgg cca gag 1309
Lys Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu
400 405 410 415

atg ctg agc gag cag gag cac atg agc atc tcg ggc agt agc gcc cga 1357
Met Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg
420 425 430

cac atg gtg atg cag aag ctg ctc cgc aag cag gag tct aca gtg atg 1405

His Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met
 435 440 445

gtt ctg cgc aac atg gtg gac ccc aag gac atc gat gat gac ctg gaa 1453
 Val Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu
 450 455 460

ggg gag gtg aca gag gag tgt ggc aag ttc ggg gcc gtg aac cgc gtc 1501
 Gly Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val
 465 470 475

atc atc tac caa gag aaa caa ggc gag gag gag gat gca gaa atc att 1549
 Ile Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile
 480 485 490 495

gtc aag atc ttt gtg gag ttt tcc ata gcc tct gag act cat aag gcc 1597
 Val Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala
 500 505 510

atc cag gcc ctc aat ggc cgc tgg ttt gct ggc cgc aag gtg gtg gct 1645
 Ile Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala
 515 520 525

gaa gtg tac gac cag gag cgt ttt gat aac agt gac ctc tct gcg tga 1693
 Glu Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
 530 535 540

cagtgtccc tctccccgga cttgcacttg ttcccttggtt cctctggggtt ttatagtgat 1753

acagtgggtgt ccccgggggcc aggcgcgctc tgcccagccc agcctacagt gcggataaag 1813

gtgcgggatgc tgctggccct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1853

<210> 2

<211> 542

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Thr	Ala	Thr	Ile	Ala	Leu	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Gln	Gly	Gly
1				5					10					15	
Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys
			20					25					30		
Trp	Lys	Pro	Pro	Gln	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Lys	Met	Glu	Asn	Gly	Gln
			35				40					45			
Ser	Thr	Ala	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Gln
			50				55					60			
Glu	Ala	Leu	Gln	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Ala	Met	Glu	Gln	Ser	Ile	Lys
			65				70				75			80	
Ser	Val	Leu	Val	Lys	Gln	Thr	Ile	Ala	His	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Thr
				85					90					95	
Asn	Leu	Gln	Met	Ala	Ala	Gln	Arg	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Ile	Met	Cys
			100					105						110	
Arg	Val	Tyr	Val	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Asp	Thr	Ile
			115					120						125	
Arg	Gln	Ala	Phe	Ala	Pro	Phe	Gly	Pro	Ile	Lys	Ser	Ile	Asp	Met	Ser
			130				135							140	

Trp Asp Ser Val Thr Met Lys His Lys Gly Phe Ala Phe Val Glu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Val Pro Glu Ala Ala Gln Leu Ala Leu Glu Gln Met Asn Ser Val
 165 170 175
 Met Leu Gly Gly Arg Asn Ile Lys Val Gly Arg Pro Ser Asn Ile Gly
 180 185 190
 Gln Ala Gln Pro Ile Ile Asp Gln Leu Ala Glu Glu Ala Arg Ala Phe
 195 200 205
 Asn Arg Ile Tyr Val Ala Ser Val His Gln Asp Leu Ser Asp Asp Asp
 210 215 220
 Ile Lys Ser Val Phe Glu Ala Phe Gly Lys Ile Lys Ser Cys Thr Leu
 225 230 235 240
 Ala Arg Asp Pro Thr Thr Gly Lys His Lys Gly Tyr Gly Phe Ile Glu
 245 250 255
 Tyr Glu Lys Ala Gln Ser Ser Gln Asp Ala Val Ser Ser Met Asn Leu
 260 265 270
 Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val Gly Lys Ala Val Thr Pro
 275 280 285
 Pro Met Pro Leu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Gly Gly Leu Pro Pro Ala
 290 295 300
 Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Ile Thr Ala Gln Glu
 305 310 315 320
 Ala Val Ala Gly Ala Ala Val Leu Gly Thr Leu Gly Thr Pro Gly Leu
 325 330 335
 Val Ser Pro Ala Leu Thr Leu Ala Gln Pro Leu Gly Thr Leu Pro Gln
 340 345 350
 Ala Val Met Ala Ala Gln Ala Pro Gly Val Ile Thr Gly Val Thr Pro
 355 360 365
 Ala Arg Pro Pro Ile Pro Val Thr Ile Pro Ser Val Gly Val Val Asn

370 375 380
 Pro Ile Leu Ala Ser Pro Pro Thr Leu Gly Leu Leu Glu Pro Lys Lys
 385 390 395 400
 Glu Lys Glu Glu Glu Glu Leu Phe Pro Glu Ser Glu Arg Pro Glu Met
 405 410 415
 Leu Ser Glu Gln Glu His Met Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ala Arg His
 420 425 430
 Met Val Met Gln Lys Leu Leu Arg Lys Gln Glu Ser Thr Val Met Val
 435 440 445
 Leu Arg Asn Met Val Asp Pro Lys Asp Ile Asp Asp Asp Leu Glu Gly
 450 455 460
 Glu Val Thr Glu Glu Cys Gly Lys Phe Gly Ala Val Asn Arg Val Ile
 465 470 475 480
 Ile Tyr Gln Glu Lys Gln Gly Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ile Ile Val
 485 490 495
 Lys Ile Phe Val Glu Phe Ser Ile Ala Ser Glu Thr His Lys Ala Ile
 500 505 510
 Gln Ala Leu Asn Gly Arg Trp Phe Ala Gly Arg Lys Val Val Ala Glu
 515 520 525
 Val Tyr Asp Gln Glu Arg Phe Asp Asn Ser Asp Leu Ser Ala
 530 535 540

【図面の簡単な説明】

【図 1】

FIRタンパク質c-myc転写抑制能を有するか否かを調べたCATアッセイの結果である。

【図 2】

内因性のc-mycプロモーターがFIRタンパク質によって転写抑制されるか否か調

べた結果であり、FIRタンパク質によるc-Mycタンパク質の発現減弱を免疫組織化学に調べた蛍光顕微鏡像である。

【図 3】

内因性のc-mycプロモーターがFIRタンパク質によって転写抑制されるか否か調べた結果であり、FIRタンパク質によるc-Mycタンパク質の減弱の程度を定量化したフローサイトメトリー解析の結果である。

【図 4】

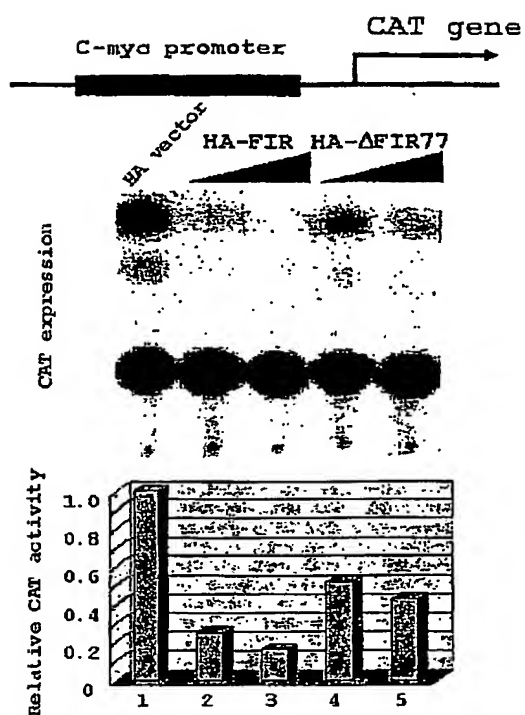
FIRタンパク質またはその欠失変異体によるアポトーシス誘導を調べたHeLa細胞の顕微鏡像であり、上段はFIRタンパク質、中断は欠失変異型FIRタンパク質、下段はコントロールである。

【図 5】

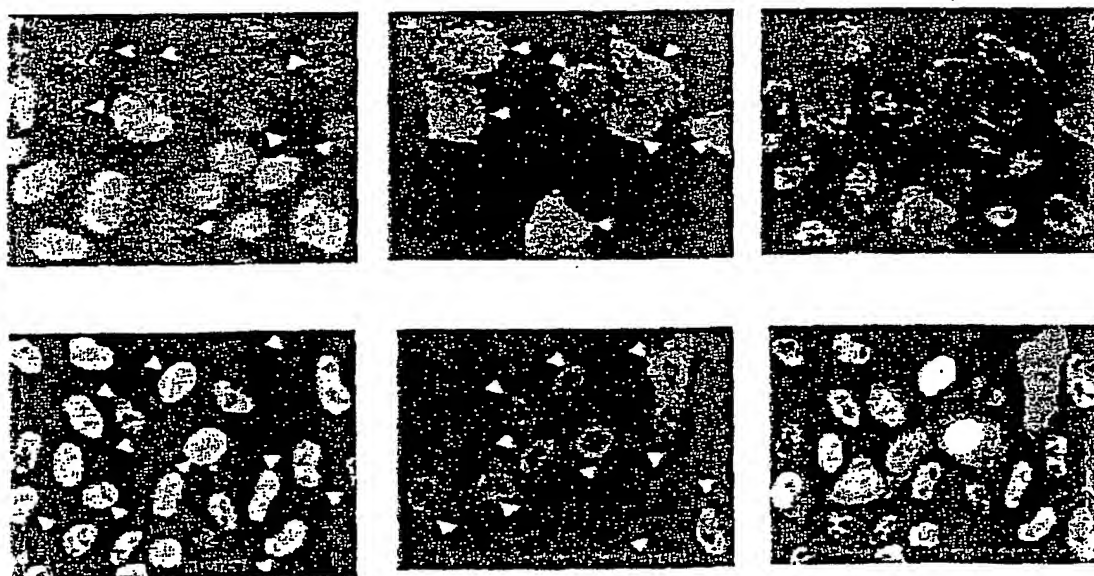
FIRタンパク質またはその欠失変異体によるアポトーシス誘導を調べた結果であり、アポトーシスの認められた細胞を定量化するためのtwo-color analysisの結果である。

【書類名】 図面

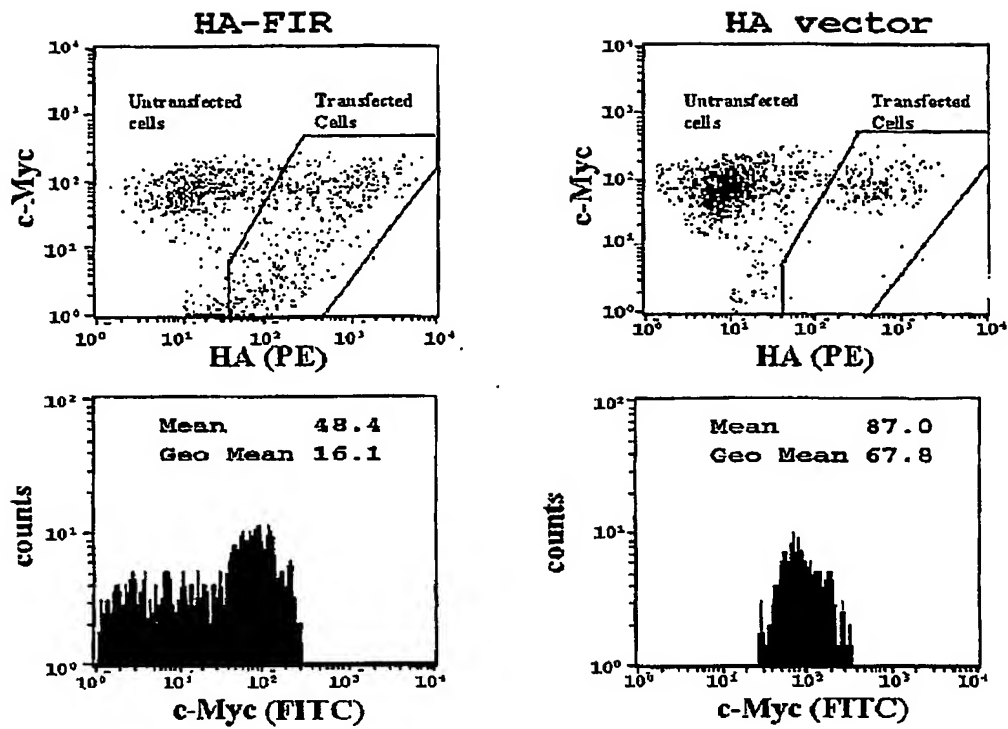
【図 1】



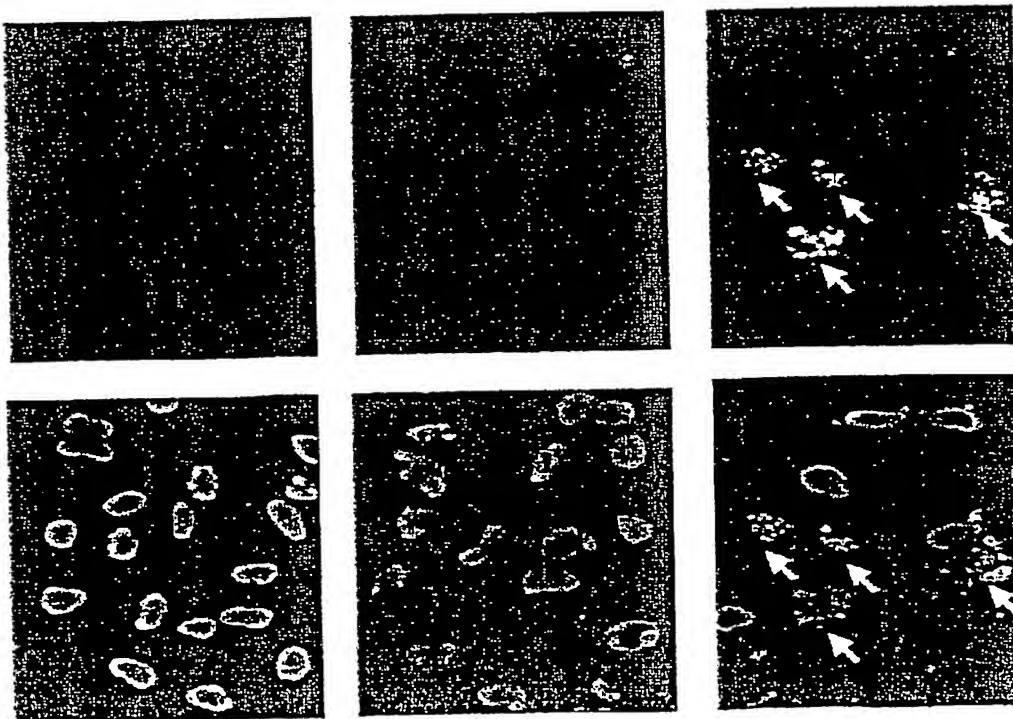
【図 2】



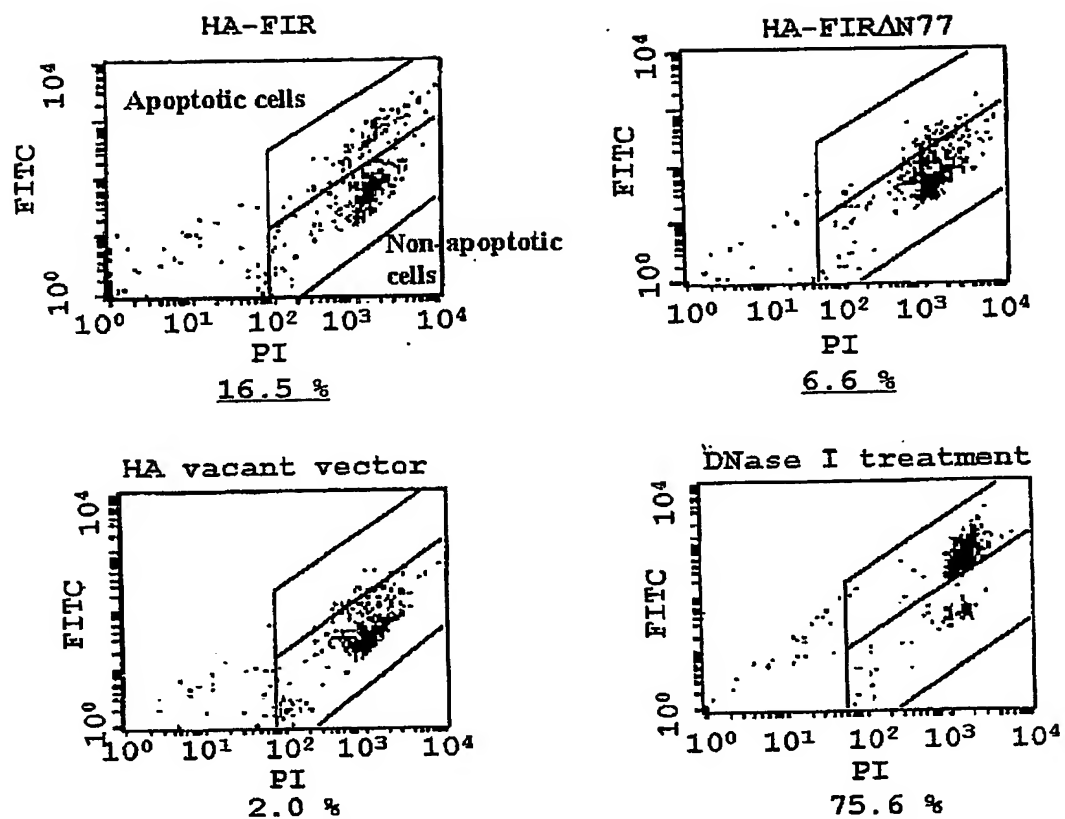
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 c-myc遺伝子を標的として、細胞アポトーシスを安定かつ確実に誘導するための新しい手段を提供する。

【解決手段】 FBPタンパク質と相互作用するタンパク質、またはこのタンパク質をコードするポリヌクレオチドが細胞内に導入可能な形態を有することを特徴とするアポトーシス誘導剤と、このアポトーシス誘導剤を細胞に接触させる工程を含むことを特徴とするアポトーシス誘導方法。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-116299
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-116299

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1998年 2月24日

名称変更

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 1 6 2 9 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構